

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI "FEDERICO II"

FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA

DIPARTIMENTO DI PATOLOGIA SISTEMATICA

Direttore: Prof. Fabio Ayala



**TESI DI DOTTORATO DI RICERCA
IN
DERMATOLOGIA SPERIMENTALE XX CICLO
2004-2007**

**Disregolazione del controllo epigenetico
della proliferazione cellulare mediato dal
fattore di aggregazione cromatinica 1 (CAF -1)
in melanomi umani ed in topi nudi
xenotrapiantati
UCLA-SO-M14 (M14) e B16**

COORDINATORE

Ch.mo Prof.

Fabio Ayala

CANDIDATO

Dott. ssa

Amelia Longobardi

INDICE

1.	<u>Epidemiologia e fattori di rischio</u>	pag. 3-4
2.	<u>Aspetti biologici e genetici</u>	pag. 5-7
3.	<u>Materiale e metodi</u>	pag. 8-13
4.	<u>Risultati</u>	pag. 14-17
5.	<u>Discussione</u>	pag. 18-30
6.	<u>Bibliografia</u>	pag 31-35
	<u>Tabelle</u>	pag 36-38
	<u>Fotografie</u>	pag 39-41

1. EPIDEMIOLOGIA E FATTORI DI RISCHIO

L'incidenza dei tumori maligni cutanei ha registrato, negli ultimi 20 anni, un progressivo e continuo incremento. Questo trend è particolarmente evidente nella popolazione di origine caucasica del Nord Europa ed in quella australiana. [1-3] Il melanoma maligno cutaneo (CMM), pur rappresentando il 5% di questi tumori, è responsabile del 71% di tutte le morti per neoplasia maligna cutanea. Ogni anno si registrano circa 100.000 nuovi casi di CMM, di cui circa 53.000 negli Stati Uniti (con un tasso d'incremento annuo pari a circa il 3%). [1, 4-8] In Italia, il tasso d'incidenza è compreso tra 3,6 e 4,1 per 100.000 abitanti all'anno, con punte superiori a 9 per 100.000 abitanti a Trieste, e superiori al 5-6/100.000 a Genova, in Veneto ed in Romagna. [9, 10] Nonostante una approfondita conoscenza dei fattori di rischio esogeni (esposizione intermittente agli UV, ustioni solari) [11-13] ed endogeni (elevato numero di nevi, fototipo chiaro, presenza di nevi displastici) [8,14,15] e l'attivazione di campagne di prevenzione nella maggior parte dei paesi occidentali,

con particolare diffusione in U.S.A. ed in Australia, in assoluto l'incidenza del CMM nella popolazione bianca dei paesi occidentali industrializzati è in crescita ad un ritmo superiore a quello di qualsiasi altro tumore. Il miglioramento delle tecniche diagnostiche, soprattutto dovuto alla standardizzazione dell'interpretazione dei quadri dermoscopici in epiluminescenza (ELM), ha condotto all'identificazione delle lesioni melanocitiche a rischio in fase sempre più precoce di sviluppo, rispetto ai dieci anni precedenti; nonostante ciò, il tasso di mortalità per CMM non ha mostrato una significativa tendenza al decremento [16], confermando che la nota, estrema aggressività biologica della maggior parte di questi tumori, può essere già presente nelle fasi iniziali del loro sviluppo. Questo è il motivo per il quale la comunità scientifica continua ad insistere nella ricerca di nuovi marcatori biomolecolari, in grado di decifrare correttamente il grado di aggressività biologica dei singoli casi di CMM.

2 ASPETTI BIOLOGICI E GENETICI DEL MELANOMA CUTANEO

La valutazione prognostica del CMM si basa attualmente su criteri istologici (spessore della lesione secondo Breslow, livello di invasione sec. Clark; presenza di ulcerazione ed indice mitotico). Questi parametri, però, non sono in grado di dare indicazioni valide in tutti i casi: fra i CMM sottili (<1 mm di spessore: sopravvivenza a 5 anni del 96% dei casi) esiste un sottogruppo di lesioni che può dare metastasi precocemente e, al contrario, CMM spessi (> 2mm) possono rimanere localizzati per molti anni. [17]

Studi di genomica e di proteomica hanno dimostrato nei CMM la presenza di alterazioni genetiche e/o di alterata espressione di diversi oncogeni e geni soppressori tumorali. [18,19]

È ormai evidente che alterazioni molecolari pressoché costanti in questi tumori riguardano diversi geni direttamente coinvolti nel controllo della normale progressione del ciclo cellulare e della riparazione dei danni del DNA. [20-21-22]

In un precedente studio abbiamo dimostrato che l'overespressione di PARP-1 (poli[ADP-ribosio]

polimerasi) normalmente coinvolta nella regolazione della progressione del ciclo e, contemporaneamente, nella riparazione dei danni del DNA, risulta significativamente correlata a melanomi caratterizzati da più elevata aggressività. [23] Pertanto, ci proponiamo attualmente di valutare, nella stessa serie di pazienti, l'espressione della subunità proteica (p60) del complesso CAF-1 (fattore di aggregazione cromatinica 1) che recenti studi indicano come uno dei più efficienti regolatori epigenetici del normale processo di replicazione cellulare e del DNA-repair ad esso connesso. Ci proponiamo, inoltre, di valutare l'espressione della subunità proteica (p60) del complesso CAF-1 (fattore di aggregazione cromatinica 1) in topi nudi CD-1 in cui è stato indotto lo sviluppo di melanoma a seguito dello xenotrapianto di linee stabilizzate di melanoma umano UCLA-SO-M14 (M 14) ed in topi nudi CD-1 in cui è stato indotto lo sviluppo di melanoma a seguito dello xenotrapianto di linee stabilizzate di melanoma murino B16. Lo scopo dello studio è quello di approfondire la valutazione del coinvolgimento delle alterazioni dei pathway responsabili del DNA-repair nel CMM, il loro rapporto con l'ampliamento del compartimento proliferativo cellulare e, soprattutto, l'eventuale ruolo prognostico

del CAF-1 p60. Inoltre, scopo del progetto è quello di valutare l'esistenza di validi presupposti teorici per la proposizione di CAF-1 p60 come possibile target di terapia molecolare in pazienti con CMM. Obiettivo non secondario del progetto sarà, infine, quello di valutare l'eventuale ruolo "trasversale" nella filogenesi di CAF-1 p60 come regolatore e marker della proliferazione cellulare.

3. MATERIALI E METODI

Selezione dei pazienti

La popolazione studio è la stessa utilizzata in precedenza per la valutazione dell'espressione di PARP-1, e costituisce il risultato della selezione di tutti i casi di melanoma maligno cutaneo primitivo escissi presso il Dipartimento di Chirurgia Plastica o il Dipartimento di Dermatologia, Unità di Precancerosi dell'Università degli Studi di Napoli Federico II, nell'intervallo di tempo compreso fra Gennaio 1985 e Dicembre 1998. Tutti i casi di CMM selezionati erano insorti su aree fotoesposte. I pazienti non presentavano anamnesi familiare di cancro, né storia di esposizione a fattori predisponenti noti fisici o chimici. Requisito fondamentale per l'inclusione nello studio è stata la disponibilità di un follow-up non inferiore a 3 anni.

Sono stati inoltre inclusi nello studio 5 campioni biotipici di cute normale di pazienti che avevano subito procedure chirurgiche ricostruttive per patologie non neoplastiche e 15 casi di nevi melanocitici (5 giunzionali, 5 intradermici, 5 composti), al fine di consentire la costruzione di una scala di valutazione

semiquantitativa di espressione di p60 rispetto ai melanociti normali e neoplastici non maligni.

Per ogni caso un'inclusione paraffinata rappresentativa della neoplasia è stata selezionata dagli archivi del Dipartimento di Scienze Biomorfologiche e Funzionali dell'Università degli Studi di Napoli "Federico II" i, Sezione di Anatomia Patologica e Citopatologia, ed utilizzata per ottenere sezioni seriate. Una delle sezioni è stata colorata con ematossilina/eosina per confermare la diagnosi iniziale, le altre sono state utilizzate per l'indagine immunohistochimica.

La valutazione dello spessore del melanoma è stata effettuata secondo i criteri del nuovo sistema di stadiazione AJCC, American Joint Committee on Cancer, 2001 (≤ 1.00 mm; 1.01-2.00 mm; 2.01-4.00 mm; > 4.01 mm). [24,25]

Selezione delle biopsie di topi nudi xenotrapiantati
UCLA-SO-M14 (M14)

Sono state selezionate 20 biopsie escissionali sviluppate in seguito allo xenotrapianto della linea stabilizzata di melanoma umano UCLA-SO-M14 (M 14) (linea di melanoma umano metastatico, American Type Culture Collection-Manassas VA). [26] Una singola sospensione di

5 X 10⁶ cellule in 0,2 ml di PBS è stata inoculata per via sottocutanea nella zampa posteriore di 20 topi nudi di background CD-1 outbred di 6/8 settimane di età. A cinque giorni dall'impianto si osservava la presenza di una massa palpabile di 70 mm³ di dimensioni nel punto di inoculazione; dopo 30 giorni al raggiungimento di un cut off di 1500 mm³ sono state effettuate, per ciascun topo, biopsie escissionali fissate in formalina neutra tamponata al 10% ed incluse in paraffina. L'inclusione paraffinata è stata utilizzata per ottenere sezioni seriate di 4 micron di spessore. Una delle sezioni è stata colorata con ematossilina/eosina per confermare la presenza del melanoma, le altre sono state utilizzate per l'indagine immunohistochimica.

Selezione delle biopsie di topi nudi xenotrapiantati B16

Sono state selezionate 10 biopsie escissionali sviluppate in seguito allo xenotrapianto della linea stabilizzata di melanoma murino B16. Una singola sospensione di 5 X 10⁶ cellule in 0,2 ml di PBS è stata inoculata per via sottocutanea nella zampa posteriore di 10 topi nudi di background CD-1 outbred di 6/8 settimane di età. A cinque giorni dall'impianto si osservava la presenza di una massa palpabile di 70 mm³ di dimensioni nel punto

di inoculazione; dopo 30 giorni al raggiungimento di un cut off di 1500 mm³ sono state effettuate, per ciascun topo, biopsie escissionali fissate in formalina neutra tamponata al 10% ed incluse in paraffina. L'inclusione paraffinata è stata utilizzata per ottenere sezioni seriate di 4 micron di spessore. Una delle sezioni è stata colorata con ematossilina/eosina per confermare la presenza del melanoma, le altre sono state utilizzate per l'indagine immunoistochimica.

Immunoistochimica

Per ogni campione sezioni di quattro micron sono state trattate con metodica immunoistochimica standard, dopo sparaffinatura in xilene e reidratazione mediante scala degli alcoli fino all'acqua distillata demonizzata. L'attività delle perossidasi endogene è stata inibita con H₂O₂ al 3% per 30 minuti. Successivamente, le sezioni sono state trattate con siero bovino diluito all'1% in PBS per 30 min. allo scopo di minimizzare le reazioni aspecifiche. A questo punto è stata effettuata l'incubazione delle sezioni di biopsie dei CMM umani e dei melanomi murini xenotrapiantati M14 e B16 l'incubazione per 1 ora a temperatura ambiente con il seguente anticorpo primario: anti CAF-1 p60 (SS53 –

ab8133, Ab-cam, USA; diluizione 1:3000). Le biopsie dei topi nudi CD-1 sottoposti a xenotrapianto della linea M14 sono state trattate, oltre che con p60, anche con l'anti HMB45 (mAb, Dako; diluizione 1:50) e con l'anti S100 (mAb, Dako; diluizione 1:40). In seguito è stata applicata la metodica convenzionale biotina-streptavidina (DAKO labeled streptavidin-biotin-complex/ horse-radish peroxidase; Carpenteria, CA). L'avvenuta reazione è stata evidenziata con diaminobenzidina allo 0.03% (3-3'-Diaminobenzidine tetrachloride; Vector Laboratories, Burlingame, CA). Dopo un debole contrasto nucleare con ematossilina, le sezioni sono state poi montate con un mezzo sintetico (Entellan; Merck, Darmstadt, Germany).

Per ogni seduta di colorazione sono stati effettuati controlli positivi e negativi, utilizzando sezioni di carcinoma infiltrante della mammella per CAF-1 p60. E' stato considerato positivo solo un definito segnale nucleare marrone.

L'immunopositività è stata valutata come percentuale di cellule immunoreattive sul totale di cellule neoplastiche presenti in 10 campi rappresentativi a forte ingrandimento.

L'indice di positività per l'anticorpo è stato espresso semiquantitativamente secondo il seguente score: 0

(<5% di cellule positive); + (5%-<15%); ++ (15%-<30%); +++ (\geq 30%).

Analisi statistica

E' stato considerato come tempo libero da malattia il tempo tra la data dell'escissione del melanoma primitivo e quella della prima metastasi linfonodale, recidiva o metastasi a distanza. La valutazione della significatività statistica di ognuno dei parametri di immunoistochimica considerati nello studio rispetto ai dati clinicopatologici per ogni paziente e per categorie uniformi di lesioni è stata effettuata test chi quadro, test di Kaplan-Meier, "log rank test" ed analisi univariata.

Come valore di cut-off di significatività è stato considerato $P < 0.05$. E' stato utilizzato il software S-Plus 2000 (MathSoft Inc. United Kingdom).

4. Risultati

Parametri clinico-patologici

La popolazione-studio è risultata costituita da 80 pazienti (43 di sesso maschile e 37 di sesso femminile), con età media pari a 44.5 anni (range 18-71 anni) Il follow-up medio è risultato pari a 108 mesi (range: 36-144 mesi). In ogni caso le lesioni erano state escisse con ampio margine di tessuto indenne. Lo spessore del melanoma è risultato ≤ 1 mm in 14 pazienti (17,5%); compreso fra 1.01 e 2.00 mm in 38 pazienti (47,5%) e compreso tra 2.02 e 4.00 mm in 28 pazienti (35%). In nessun caso la lesione aveva spessore > 4 mm (Tab I).

[24,25]

Degli 80 pazienti, 15 hanno sviluppato malattia metastatica (7 metastasi ai linfonodi locoregionali, 1 metastasi cutanea, in 1 caso metastasi ai linfonodi loco-regionali e cutanea ed in 6 pazienti metastasi ai linfonodi loco-regionali ed a distanza [tabella II]).

Come previsto, l'intervallo libero da malattia correlava con lo spessore della lesione sec. Breslow: fra i pazienti con malattia metastatica, in 9 casi lo spessore della lesione era compreso tra 2,01 e 4.00, in 5 tra 1.01 e 2.00 e solamente in 1 paziente lo spessore era < 1 mm sec. Breslow. Quindi, nel sottogruppo 2.01-4.0 la

percentuale di recidive era del 32,1% (9 pazienti su 28), nel sottogruppo 1.01-2.0 era del 13,1% (5 pazienti su 38) e nel sottogruppo < 1.0 mm del 7% (1 paziente su 14).

Immunopositività per CAF-1 p60 nei melanociti normali
Nei 5 campioni di cute normale, i melanociti hanno mostrato focale, isolata positività per p60 (range compreso fra 1:7 e 1:20).

Immunopositività per CAF-1 p60 nei nevi melanocitici-controllo

I melanociti hanno mostrato positività per p60 compresa fra il 5% ed 10%(+), con i valori più elevati nella componente nevica giunzionale e dermica superficiale. Pressoché assente l'espressione di p60 nella quota di melanociti dermici profondi.

Immunopositività per CAF-1 p60 nei melanomi maligni umani

Tutti i casi di CMM valutati hanno mostrato evidente overespressione nucleare di p60, sia nella fase di crescita radiale che verticale (range: 50-90%, +++), in gran parte nelle lesioni di spessore maggiore, ma osservabile anche in casi di spessore compreso fra 1.01

e 2.00, e perfino in 1 caso $< 1\text{mm}$. In particolare, livelli di p60 pari a +++ sono stati evidenziati in 3 casi nella componente radiale e in 15 casi nella fase di crescita verticale; livelli di p60 pari a ++ sono stati riscontrati in 13 casi nella fase radiale di crescita ed in 19 casi in quella verticale, livelli di p60 pari a + sono stati riscontrati in 64 casi nella fase radiale ed in 46 casi in quella verticale (figure 1-2).

L'analisi statistica dei risultati non ha evidenziato differenze significatività di espressione di p60 fra la fase radiale e la fase verticale dei singoli casi di CMM ($p < 0.05$). Estremamente significativa è risultata la differenza di espressione di p60 fra CMM senza e con recidiva, metastasi, morte ($p < 0.01$). Nessuna significatività è emersa dal raffronto fra l'espressione di p60, età e sesso dei pazienti ($p > 0.05$).

Immunopositività per HMB45 e S100 nelle biopsie di topi nudi xenotrapiantati UCLA-SO-M14 (M14)

I casi di MM valutati hanno mostrato evidente espressione di HMB45 e S100 (figure 3-4).

Immunopositività per CAF-1 p60 nelle biopsie di topi nudi xenotrapiantati UCLA-SO-M14 (M14)

I casi di MM valutati hanno mostrato evidente overespressione nucleare di p60, sia nella fase di crescita radiale che verticale (range: 50-90%, +++) (figura 5).

Immunopositività per CAF-1 p60 nelle biopsie di topi nudi xenotrapiantati B16.

I casi di MM valutati hanno mostrato evidente overespressione nucleare di p60, sia nella fase di crescita radiale che verticale (range: 50-90%, +++) (figura 6).

5. Discussione

L'approfondita conoscenza del processo di carcinogenesi è il presupposto indispensabile per la formulazione e la messa a punto di strategie ottimali per la prevenzione e per la cura del cancro.

Il proliferare dei dati molecolari registrata negli ultimi 20 anni ha consentito indubbiamente una soddisfacente visione "generale" del processo di trasformazione cellulare, chiarendo molti degli aspetti molecolari dei pathways di regolazione della proliferazione e della morte cellulare programmata (apoptosi).

Ci troviamo attualmente in una fase critica di questo processo di comprensione. Del tutto recentemente, alcuni gruppi di ricerca europei ed americani hanno avanzato l'ipotesi che debba essere necessario riconsiderare criticamente la classica teoria multistep della carcinogenesi (iniziazione-promozione-progressione-invasione-metastasi). Ad esempio, sono emerse evidenze che ci costringono a modificare il concetto di iniziazione. Quest'ultima, infatti, non è necessariamente caratterizzata dall'immortalizzazione di una cellula in origine differenziata e mortale: in diversi casi, l'iniziazione può essere la conseguenza

della prevenzione della “mortalizzazione” e differenziazione di una cellula staminale, “naturalmente” immortale. [27]

Questo implica ovviamente la necessità di considerare gli effetti di ciò anche sulle tappe successive della cancerogenesi, che necessiteranno quindi di un'ulteriore valutazione critica alla luce dei crescenti dati molecolari emergenti e, di sicuro, potrà contribuire, almeno in parte, alla comprensione della reinterpretazione della teoria della metastatizzazione, cui stiamo attualmente assistendo.

Negli ultimi anni, infatti, i dati di patologia sperimentale hanno dimostrato che il dogma classico della progressione step-by-step da cellula trasformata a cellula tumorale in grado di invadere e metastatizzare è, almeno in parte, errato. È altamente probabile che, nella maggior parte dei tumori umani, esista un clone di cellule neoplastiche in possesso del fenotipo metastatico già nelle fasi iniziali della crescita tumorale. La latenza con la quale tali cellule daranno segno di sé con la formazione di metastasi a distanza clinicamente evidenti è intimamente correlata al concetto della “tumor dormancy”, variabile da tumore a tumore e da paziente a paziente e, in qualche modo, spiegabile

anche con la probabile derivazione di una parte dei tumori dalle cellule staminali.

Attualmente, resta comunque invariato il concetto che non esistono due neoplasie maligne di eguale istotipo che presentino un identico genotipo, pur condividendo alcune caratteristiche importanti del loro fenotipo. Queste differenze sono responsabili del diverso comportamento biologico di neoplasie identiche dal punto di vista morfologico a parità di stadio. [28] Appare quindi di fondamentale importanza la necessità di individuare, per ogni tipo di tumore e per ogni singolo caso di neoplasia, quel set di alterazioni geno/fenotipiche (*tumor fingerprint*) capaci di definire il potenziale di aggressività biologica della neoplasia, in termini di propensione all'aggressività locale (invasività) e, in particolar modo, di capacità metastatizzante. Negli ultimi dieci anni si sono accumulate sufficienti evidenze (sperimentali e non) indicanti che, nella fase di progressione tumorale, le cellule neoplastiche hanno raggiunto uno stato di instabilità genomica tale da favorire il sequenziale accumulo di ulteriori alterazioni genetiche ed epigenetiche in grado di indurre il fenotipo invasivo-metastatico.[28]

Decine di modificazioni epigenetiche consentono di norma la corretta regolazione dell'espressione genica. L'acetilazione istonica e la metilazione del DNA sono quelle meglio caratterizzate. [29]

Le modificazioni post-sintetiche del DNA e delle proteine della cromatina rivestono estrema importanza in quanto, interferendo con la struttura della cromatina, ne determinano il suo rimodellamento, regolando l'accessibilità alle informazioni presenti sul DNA. Le alterazioni epigenetiche che riguardano il controllo del rimodellamento del DNA sono fondamentali per la patogenesi e per l'evoluzione di diverse patologie umane, in primo luogo delle sindromi mielodisplastiche e l'eventuale evoluzione in leucemia di alcune di esse. Oltre al gene p15INK4A, (codificante per proteine che regolano negativamente il ciclo cellulare mediante l'inibizione delle chinasi ciclino-dipendenti 4 e 6), nell'induzione delle mielodisplasie e nella genesi di diverse neoplasie solide umane, fra cui tumori dell'ovaio e della mammella, sono state riscontrate modificazioni epigenetiche di geni coinvolti nella riparazione del DNA, fra i quali MGMT e BRCA-1.

Una delle più note modificazioni epigenetiche post-sintetiche del DNA è la poli ADP-ribosilazione.

In un recente studio, abbiamo dimostrato che la presenza di alterazioni del processo di poli-ADP-ribosilazione caratterizza sottogruppi di CMM a prognosi sfavorevole. [23]

Questo risultato ci ha spinto ad indagare l'esistenza di ulteriori alterazioni dei pathway di riparazione del DNA, nella stessa popolazione valutata per PARP-1. E' noto infatti che esistono numerosi sistemi di controllo cellulare (Checkpoint Machinery=CPM) che hanno il compito fondamentale di individuare e riconoscere la presenza di danni al DNA, garantendo il mantenimento dell'integrità del genoma e la corretta progressione del ciclo cellulare. [30] I diversi CPM rispondono al danno del DNA in maniera univoca, bloccando cioè la progressione del ciclo cellulare per il tempo necessario alla riparazione. Questa strategia permette la replicazione e la segregazione di cromosomi altrimenti danneggiati, potenziale causa di instabilità genomica. [30,31] In ogni caso, l'identificazione e la riparazione dei danni al DNA si svolgono all'interno del nucleo, nel cosiddetto "*ambiente cromatinico*", [24,27] costituito da unità di base di DNA spiralizzato intorno ad ottametri istonici (nucleosomi) [30,32,33] associati a proteine cromatiniche non istoniche ed a proteine leganti gli istoni. [32]

La regolazione della spiralizzazione della cromatina serve non solo a compattare il DNA all'interno del nucleo, ma partecipa attivamente alla replicazione cellulare, alla riparazione del DNA ed alla regolazione dell'espressione genica. [33]

Il fattore 1 di assemblaggio cromatinico (CAF-1), istone chaperone da noi indagato in questo studio, svolge un ruolo altamente specializzato, sia durante la replicazione che durante la riparazione del DNA, mediando il primo step della compattazione cromatinica attraverso l'assemblaggio dei nucleosomi, legando gli istoni H3 ed H4 al DNA neosintetizzato. [30,32,33]

CAF-1 in maniera del tutto peculiare ed unica per i fattori di aggregazione cromatinica, durante la fase S, è localizzato presso i siti intranucleari di replicazione e la sua forma attiva è presente anche in fase G1/G2; solo in mitosi, si dissocia dalla cromatina e diviene inattivo. [34]

Questa ripartizione intracellulare di CAF-1 è osservabile per ognuna delle tre subunità proteiche da cui è costituito. [26,28]

Mentre la p48 (RbAp48) è prevalentemente coinvolta nella regolazione negativa della crescita cellulare mediante stretta collaborazione con la proteina Rb, [32] le altre due subunità di CAF-1 svolgono invece azione

regolatrice nei processi di di replicazione e riparazione del DNA. La p150 sembra maggiormente attiva nei processi di riparazione, mentre la p60 è più specificamente connessa al controllo della replicazione cellulare. Del tutto recentemente, p60 è stata proposta come nuovo marker di proliferazione cellulare, con un grado di sensibilità maggiore rispetto ai marcatori tradizionali. [35]

CAF-1 è davvero peculiare nella sua azione di assemblaggio, poiché assembla solo DNA che è andato incontro a replicazione. Ciò è dovuto al fatto che la sua attività richiede necessariamente l'interazione con l'Antigene Nucleare di Proliferazione Cellulare (PCNA), che, come è noto, specificamente marca il DNA di nuova sintesi. [35,36] ed è a sua volta coinvolto nei processi di replicazione, excision repair, ricombinazione, riparazione dei single strands breaks (SSB) e coesione di cromatidi fratelli.[37]

Per l'assemblaggio cromatinico mediato da CAF-1 è necessaria la colocalizzazione di CAF-1 e PCNA presso i siti di replicazione.

Il richiamo contemporaneo di PCNA e CAF-1 presso i siti danneggiati del DNA è dipendente dal numero delle lesioni ed è un processo energia-dipendente; l'interazione tra le due molecole provvede al

coordinamento di una serie di segnali prodotti durante il danno. [37,38]

Un primo segnale porterebbe al reclutamento di p150 al di fuori della fase S e sarebbe strettamente connesso alla riparazione del danno cellulare. La subunità p60, come precedentemente accennato, sarebbe invece più specificamente coinvolta nella replicazione cellulare. [37]

I dati emersi dal presente studio hanno evidenziato una tendenza progressiva all'incremento del segnale per p60 nei CMM umani caratterizzati da un comportamento biologico più aggressivo, con elevata incidenza di localizzazioni secondarie linfonodali e/o a distanza, e/o morte per malattia.

In particolare, nei nostri casi, l'espressione di p60 è risultata particolarmente elevata nelle neoplasie caratterizzate da maggiore indice mitotico e prevalente fase di crescita verticale. Ciò è comprensibile se si pensa che CAF-1 p60 è down-regolata nelle cellule quiescenti, mentre risulta overespressa in cellule neoplastiche sperimentali ed umane. [39] Ciò è comprensibile, in considerazione del ruolo di p60 nel complesso CAF-1: quest'ultimo contribuisce al mantenimento della struttura cromosomica prima e dopo la formazione della forcina di replicazione e sembra essere coinvolto nella transitoria

destabilizzazione dei nucleosomi richiesta per il passaggio della forcina di replicazione. CAF-1 p60, in particolare, è in grado di interferire inoltre indirettamente con la replicazione, alterando la morfologia tridimensionale del DNA mediante l'introduzione di supereliche negative di DNA da parte dei nucleosomi, contribuendo allo svolgimento del DNA; per questo il disgregamento dei nucleosomi è importante nella progressione della forcina di replicazione. [40] L'analisi semiquantitativa di espressione ha evidenziato, nei nostri casi che p60 è in grado di discriminare fra CMM con e senza recidiva e/o metastasi alla fine del follow-up, suggerendo un suo ruolo di rilievo nella valutazione prognostica dei MM.

I nostri risultati indicano che esistono i presupposti per suggerire l'analisi di p60 nella valutazione prospettica del comportamento biologico dei CMM.

CMM con elevata espressione di p60, infatti, costituirebbero un sottogruppo di tumori ad elevata aggressività biologica, a parità dei principali parametri clinico-patologici, rispetto al gruppo di neoplasie con bassi valori di p60.

Questi risultati appaiono, peraltro, pienamente in linea con quelli riportati sulla perdita di funzione della poli-ADP-ribosilazione in un sottogruppo ad alto rischio di

pazienti con CMM, confermando quindi l'esistenza di una severa compromissione di uno dei principali sistemi di controllo epigenetico del "DNA-repair" associato ad una spinta proliferativa almeno in parte dovuta all'alterazione dei meccanismi di regolazione della condensazione e di despiralizzazione della cromatina. [23] Ciò apre nuovi spiragli alla possibilità di previsione prognostica ed eventuale nuova impostazione terapeutica per un sottogruppo a rischio particolarmente elevato di pazienti con CMM. Questa prospettiva è estremamente confortante, se si pensa che, nonostante l'indiscutibile avanzamento delle capacità di diagnosi precoce dei CMM, negli ultimi 15 anni non si è registrato alcun decremento significativo della mortalità globale per questa neoplasia. Ciò supporta l'idea che esistano melanomi con capacità di aggressività biologica elevatissima già nelle fasi iniziali di crescita verticale.

A tutt'oggi, la capacità evolutiva del CMM e la probabilità di risposta alla terapia dei singoli pazienti sono prevedibili con un livello di approssimazione ancora troppo elevato in base ai classici parametri istopatologici, come lo spessore della lesione, il livello di invasione, la presenza di ulcerazione e l'indice mitotico: CMM sottili possono dare metastasi e, al contrario,

melanomi spessi possono non dare origine a localizzazioni secondarie per un decennio.

Come precedentemente sottolineato, la patogenesi molecolare di questa neoplasia rimane in gran parte non spiegata: in particolare, le alterazioni genetiche responsabili della progressione del melanoma sono poco chiare, così come la eterogeneità del suo decorso clinico. La identificazione di piccoli sottogruppi di geni e proteine espressi in casi selezionati di melanomi è un importante obiettivo, in particolare per quanto riguarda l'associazione tra geni, proteine e fenotipo della lesione. Sono state identificate molte molecole che giocano un ruolo importante nelle capacità di progressione e di metastatizzazione dei melanomi. Un aumentato numero di cellule positive per Ki67 (evidenziato con Mib1 su sezioni paraffinate), per Ciclina A, ciclina D, p35, MMP-2, integrine beta1 e beta2, è considerato un fattore prognostico negativo, così come la ridotta espressione da parte delle cellule neoplastiche di p16, p27, Melan A ed nm23. Tuttavia, soltanto un piccolo gruppo di queste proteine sembra poter rivestire importanza prognostica indipendente dallo spessore della lesione.

La nostra ipotesi è che esista una sottoclasse ad elevata aggressività di CMM, con severa compromissione dei meccanismi biomolecolari

responsabili del DNA-repair. La popolazione cellulare di questi melanomi sarebbe quindi caratterizzata dal sequenziale accumulo di danni al materiale genetico, con esponenziale incremento dell'instabilità genomica ed una conseguente selezione di cloni ad elevata aggressività. Inibitori selettivi di CAF-1 p60, modulando differenti bersagli specifici, potrebbero essere in grado di determinare un recupero del programma apoptotico ed un blocco della proliferazione cellulare in pazienti con CMM, inibendo lo stabilirsi di metastasi linfonodali e/o a distanza o rallentando la crescita cellulare di metastasi a distanza già stabilite. Lo screening immunohistochimico del tumore primitivo per espressione di CAF-1 p60, quindi, potrebbe rappresentare un agevole strumento di più fine valutazione prognostica dei pazienti con CMM primitivo, consentendo l'individuazione di sottoclassi ad alto rischio per malattia metastatica, da sottoporre a follow-up più stretto ed a nuovi protocolli di terapia target.

I dati relativi all'espressione immunohistochimica (+++) sia nella componente radiale che verticale in melanomi murini xenotrapiantati M14 confermano il coinvolgimento di CAF-1 p60 nella disregolazione della proliferazione cellulare in tali neoplasie e rendono tale modello murino un valido strumento di studio del

melanoma. L'espressione immunoistochimica di p60 in melanomi murini xenotrapiantati B16 in particolare conferma l'ipotizzato ruolo filogenico "trasversale" di p60 di "acceleratore" della proliferazione cellulare nelle neoplasie maligne della linea melanocitica.

6. Bibliografia

1. Cancer facts and figures 2005. Atlanta: American Cancer Society, 2005. Accessed online February 20, 2005, at: http://www.cancer.org/downloads/STT/estimated_new_cancer_cases_and_deaths_by_sex_for_all_sites_US_2005.pdf.
2. Diepgen TL, Mahler V. The epidemiology of skin cancer. Br. J. Dermatol. 2002; 146 (Suppl. 61): 1-6.
3. Boni R, Schuster C, Nehrhoff B, et al. Epidemiology of skin cancer. Neuroendocrinol Lett. 2002; 23:48-51
4. Jemal A, Murray T, Ward E, Samuels A, Tiwari RC, Ghafoor A, Feuer EJ, Thun MJ. Cancer Statistics, 2005. CA Cancer J Clin 2005; 55:10-30.
5. Rager EL, Bridgeford EP, Ollila DW. Cutaneous Melanoma: Update on prevention, screening diagnosis, and treatment. American Family Physician 2005; 72:269-275.
6. Ries LA, Eisner MP, Kosary CL, Hankey BF, Miller BA, Clegg L, et al., eds. SEER cancer statistic review, 1973-1999. Bethesda, Md.: National Cancer institute, 2002. Accessed online November 9, 2004, at: http://seer.cancer.gov/csr/1973_1999/.
7. Parkin D.M., Pisani P., Ferlay J. Estimates of the worldwide incidence of 25 major cancers in 1990. Int. J. Cancer. 1999; 80: 827-841.
8. Armstrong B.K., English D.R. Cutaneous malignant melanoma. In "Cancer Epidemiology and Prevention", D. Schottenfeld, J.F. Fraumeni Jr. (Eds.), Second Edition, Oxford University Press, New York, 1282-1312, 1996.
9. Balzi D., Bidoli E., Franceschi S., et al. Stima dell'Incidenza e Mortalità per Tumore nelle Regioni Italiane, 1990. Centro di Riferimento Oncologico, Aviano, Italia, 1997.

10. Zanetti R., Crosignani P., Ross S. Il cancro in Italia. I dati di incidenza dei Registri Tumori, 1988-1992. Volume secondo. Lega Italiana per la Lotta contro i Tumori. Associazione Italiana di Registri Tumori. Pensiero Scientifico Editore, Torino (1997).
11. IARC. Solar and ultraviolet radiation. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Vol. 55. IARC, Lyon, 73-95, 217-28, 1992.
12. Elwood J.M., Jopson J. Melanoma and sun exposure: an overview of published studies. *Int. J. Cancer.* 1997; 73: 198-203.
13. Gilchrest B.A., Eller M.S., Geller A.C., Yaar M. The pathogenesis of melanoma induced by ultraviolet radiation. *New Engl. J. Med.* 1999; 340: 1341-1348.
14. Bliss J.M., Ford D., Swerdlow A.J., et al. Risk of cutaneous melanoma associated with pigmentation characteristics and freckling: systematic overview of 10 case-control studies. *Int. J. Cancer.* 1995; 62:367-376, 1995.
15. Tucker M.A., Halpern A., Holly E.A., et al. Clinically recognized dysplastic nevi. A central risk factor for cutaneous melanoma. *JAMA.* 1997; 277: 1439-1444.
16. Welch G, Woloshin S, Schwartz Lm. Skin biopsy rates and incidence of melanoma: population based ecological study. *BMJ.* 2005 Sep 3;331(7515):481. Epub 2005 Aug 4.
17. Von Der Masse H, Osterlind A, Drzewiecki KT et al. Malignant melanoma of the Skin in Denmark-epidemiology, diagnosis and treatment. *Ugeskr Lager.* 1992;154: 1949-1953.
18. Nobori T., Miura K., Wu D.J., et al. Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers. *Nature.* 1994; 368: 753-756.
19. Eggermont AM, Keilholz U, Autier P, Ruiter DJ, Lehmann F, Lienard D. EORTC Melanoma Group. The EORTC melanoma group: a comprehensive melanoma research programme by clinicians and scientist.

- European Organization for Research and treatment of Cancer. *Eur J Cancer* 2002; 38: 114-119
20. Renan. How many mutations are required for tumorigenesis? Implications from human cancer data. *Mol Carcinog.* 1993: 139-146.
 21. Staibano S, Lo Muzio L, Pannone G, Somma P, Farronato G, Franco R, Bambini F, Serpico R, De Rosa G. P53 and hMSH2 expression in basal cell carcinomas and malignant melanomas from photoexposed areas of head and neck region. *Int J Oncol.* 2001;19:551-9.
 22. Lo Muzio L, Nocini P, Mignogna MD, Pannone G, Staibano S, Procaccini M, Rubini C, Fioroni M, Fanali S, Piattelli A. Immunocytochemical detection of hMSH2 and hMLH1 expression in oral melanoma. *Anticancer Res.* 2000;20:741-8
 23. Staibano S, Pepe S, Lo Muzio L, Somma P, Mascolo M, Argenziano G, Scalvenzi M, Salvatore G, Fabrocini G, Molea G, Bianco AR, Carlomagno C, De Rosa G. PARP-1 expresion in malignant melanomas from phoyoexposed areas of the head and neck region. *Hum Pathol.* 2005; 36:724-31.
 24. Balch CM, Buzaid AC, Atkins MB, et al.: Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. *J Clin Oncol.* 2001; 19: 3635-3648.
 25. Balch CM. Cutaneous Melanoma, in Greene FL, Page DL, Fleming ID, et al (eds). *AJCC Cancer staging manual.* 6 th ed. New York, NY: Springer Verlag. 2002; 209-217.
 26. Katano M., Saxton R. E., Cochran A. J., and Irie R. F. Establishment of an ascitic human melanoma cell line that metastasizes to lung and liver in nude mice. 2004; 197-203.
 27. Singh SK et al. Identification of a cancer stem cells in human brain tumor. *Cancer Res.* 2003; 63: 5821-7.
 28. Trosko JE, Chang CC, Upham BL, Tai MH. Ignored hallmarks of carcinogenesis: stem cells and cell-cell

- communication. *Ann NY Acad Sci.* 2004; 1028: 192-201.
29. Noma K, Allis CD, Grewall SI. Transitions in distinct histone H3 methylation patterns as the heterochromatin domain boundaries. *Science.* 2001; 293:1150-5.
 30. Merheineke K, Krude T. Nucleosome assembly activity and intracellular localization of human CAF-1 change during the cell division cycle. *J Biol Chem.* 1998; 273:15279-15286.
 31. Hoek M, Stillman B. CAF-1 is essential and couples chromatin assembly to DNA replication in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003; 100:12183-88.
 32. Henikoff S. Versatile assembler. *Nature* 2003; 423: 814-17.
 33. Tagami H, Ray-Gallet D, Almouzni G, Nakatani Y. H3.1 and H3.3 complexes mediate nucleosome assembly pathways dependent or independent of DNA synthesis. *Cell* 2004; 116: 51-61.
 34. Renan. How many mutations are required for tumorigenesis? Implications from human cancer data. *Mol Carcinog.* 1993: 139-146.
 35. Taddei A, Roche D, Sibarita JB, Turner BM, Almouzni G. Duplication and maintenance of heterochromatin domains. *J Cell Biol* 1999; 147: 1153-66.
 36. Moggs J, Grandi P, Quivy JP, Jonsson ZO, Almouzni G. A CAF-1-PCNA mediated Chromatin Assembly Pathway triggered by sensing DNA damage. *Molecular Cell Biology* 2002; 22:1206-18.
 37. Krude C. The kinetochore connection. *Current Biol* 2002; 12: 256-8.
 38. Martini E, Roche DM, Merheineke K, Verreault A, Almouzni G. Recruitment of phosphorylated chromatin assembly factor 1 after UV irradiation of Human cells. *J Cell Biol* 1998; 143: 563-75.
 39. Polo SE, Yheocharis SE, Klijaieko J, Savignoni A, Asselain B, Almouzni G. CAF-1, a marker of clinical

value to distinguish quiescent from proliferative cells. Cancer Res. 2004; 64: 2371-81.

40. Ye X, Franco AA, Santos H, Nelson DM, Kaufmann PD, Adams PD. Detective S phase chromatin assembly causes DNA damage, activation of the S phase checkpoint, and S phase arrest. Mol Cell. 2003; 11: 341-351.

Tabella 1

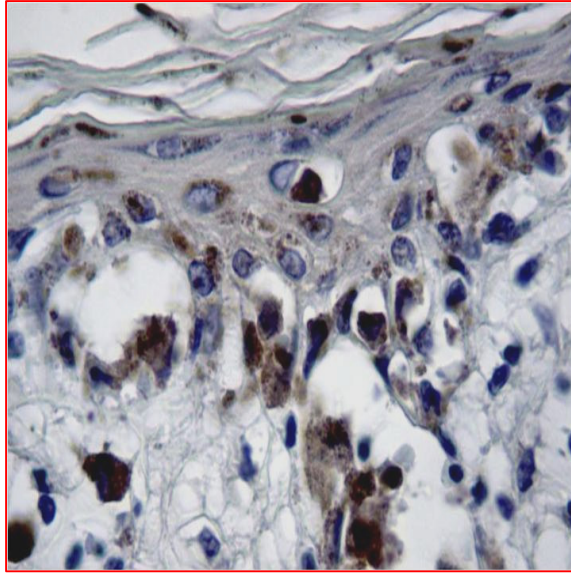
Caso no.	Età (anni)	Sex	Stadiazione AJCC	P60 r	P60v	Follow-up
1	58	F	≤1.00	+	++	12
2	36	M	≤1.00	+	+	12
3	67	M	≤1.00	+	++	12
4	45	F	≤1.00	+	+	12
5	50	F	≤1.00	+	+	11
6	49	F	≤1.00	+	+	11
7	42	M	≤1.00	+	+	10
8	43	F	≤1.00	+	+	9
9	43	M	≤1.00	+	+	9
10 *	49	M	≤1.00	+	+	7
11 *	40	M	≤1.00	+	+	7
12 *	41	M	≤1.00	+	+	7
13 *	39	M	≤1.00	++	+++	6 R
14 *	37	F	≤1.00	+	+	6
15	66	F	1.01 – 2.00	++	+++	12 N
16	65	F	1.01 – 2.00	+	+	12
17	56	M	1.01 – 2.00	+	+	12
18	49	M	1.01 – 2.00	+	+	12
19	48	M	1.01 – 2.00	+	++	12
20	39	F	1.01 – 2.00	+	+	12
21	47	F	1.01 – 2.00	++	+++	12 N,M,D
22	51	M	1.01 – 2.00	+	++	11
23	53	M	1.01 – 2.00	+	++	11
24	56	M	1.01 – 2.00	+	+	11
25	51	F	1.01 – 2.00	+	++	10
26	45	F	1.01 – 2.00	+	++	10
27	53	M	1.01 – 2.00	+	++	10
28	67	M	1.01 – 2.00	+	+	10
29	54	M	1.01 – 2.00	+	+	10
30	34	M	1.01 – 2.00	++	++	9
31	44	F	1.01 – 2.00	+	++	9
32	43	F	1.01 – 2.00	+	+	9
33	71	F	1.01 – 2.00	+	+	9
34	34	M	1.01 – 2.00	+	+	9
35	43	F	1.01 – 2.00	+	+	9
36	51	F	1.01 – 2.00	+	++	9
37	50	M	1.01 – 2.00	+	+	9
38	39	F	1.01 – 2.00	++	+++	9 N
39	29	F	1.01 – 2.00	+	+	9
40 *	42	M	1.01 – 2.00	+	++	7
41 *	37	F	1.01 – 2.00	+++	+++	7 R,N
42 *	65	M	1.01 – 2.00	+	+	7
43 *	43	M	1.01 – 2.00	+++	+++	7 N
44 *	44	F	1.01 – 2.00	+	+	6
45 *	18	F	1.01 – 2.00	+	++	4
46 *	22	M	1.01 – 2.00	+	+	4
47 *	24	M	1.01 – 2.00	+	++	4
48 *	32	M	1.01 – 2.00	+	+	4
49 *	30	F	1.01 – 2.00	+	+	4
50 *	38	F	1.01 – 2.00	+	+	4
51 *	37	M	1.01 – 2.00	+	+	3
52 *	40	M	1.01 – 2.00	+	+	3
53	40	M	2.01-4.00	+	+	12
54	36	M	2.01-4.00	+	+	12
55	39	M	2.01-4.00	+	+	11
56	50	F	2.01-4.00	+	++	11
57	48	F	2.01-4.00	+	++	11
58	45	M	2.01-4.00	++	+++	11 N,M, D
59	43	F	2.01-4.00	+	+	10
60	53	F	2.01-4.00	+	++	10
61	47	M	2.01-4.00	++	+++	10 N
62	54	M	2.01-4.00	+	+	10
63	50	M	2.01-4.00	+	++	10
64	69	F	2.01-4.00	+	+	10
65	54	M	2.01-4.00	+	+	10
66	53	M	2.01-4.00	+	+	9
67*	42	F	2.01-4.00	++	+++	9 N,M,D
68*	37	F	2.01-4.00	++	+++	9 N,M
69*	45	F	2.01-4.00	+	+	9
70*	49	F	2.01-4.00	++	+++	9 N,M,D
71*	32	M	2.01-4.00	++	+++	7 N
72*	38	F	2.01-4.00	++	+++	6 N
73*	38	M	2.01-4.00	+	+	3
74*	32	M	2.01-4.00	+++	+++	3 N,M
75*	40	M	2.01-4.00	+	+	3
76*	46	F	2.01-4.00	++	+++	3 N
77*	50	M	2.01-4.00	+	+	2
78*	24	F	2.01-4.00	+	++	2
79*	30	M	2.01-4.00	+	+	2
80 *	32	F	2.01-4.00	+	+	2

R: recidive; N: metastasi linfonodali; M: metastasi; D: morte per malattia; r*: crescita radiale;
v**: crescita verticale.

Tabella 2

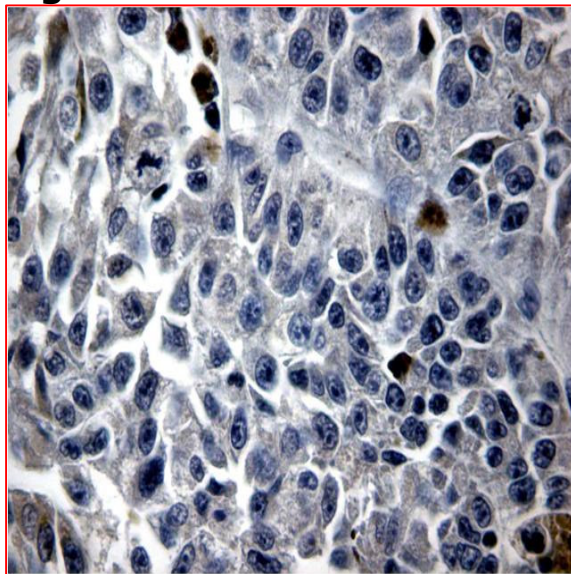
AJCC	Casi	Casi con prognosi infausta	CAF P60	Follow-up
≤1.00	14	1	+ /++ vs + /+++	R
1.01-2.00	38	1 1 1 2	+ /++ vs + /+++	N N,M,D R,N N
2.01-4.00	28	3 2 1 1 1 1	+ /++ vs + /+++	N,M,D N N,M N N,M N
> 4.00	0	0	/	/

Figura 1



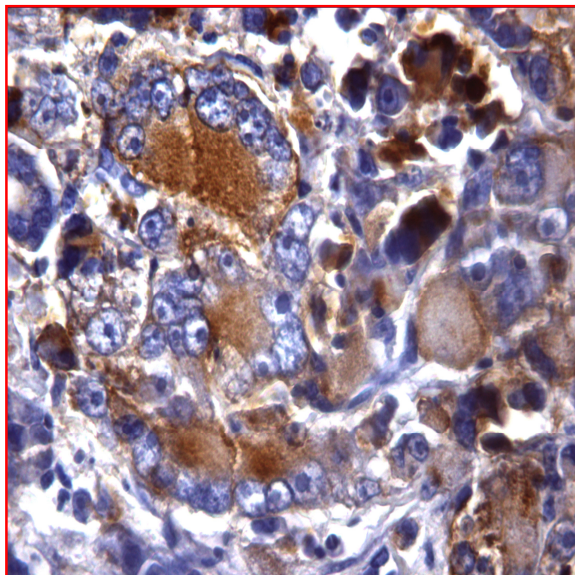
CAF-1 p 60 in CMM umano, N+M+

Figura 2



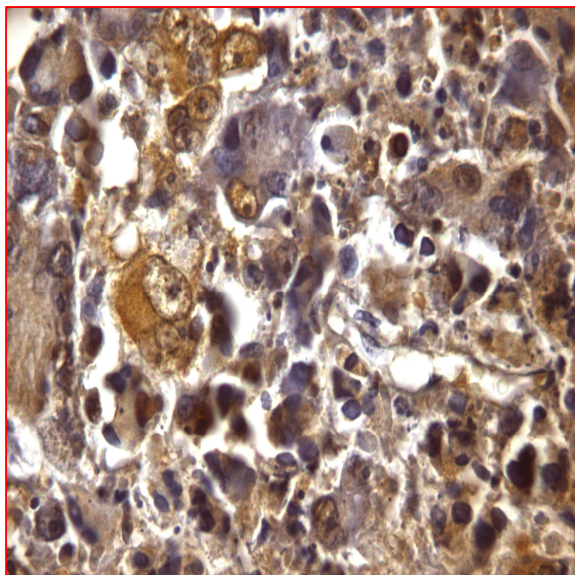
CAF-1 p60 in CMM umano, N0M0

Figura 3



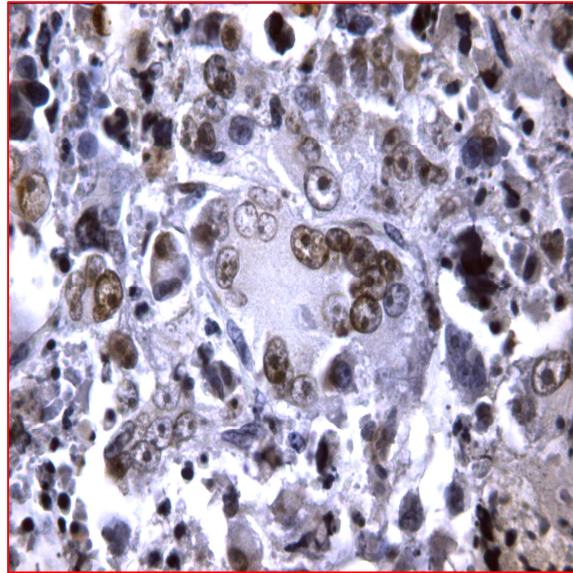
HMB45 in melanoma di topo nudo xenotrapiantato M14

Figura 4



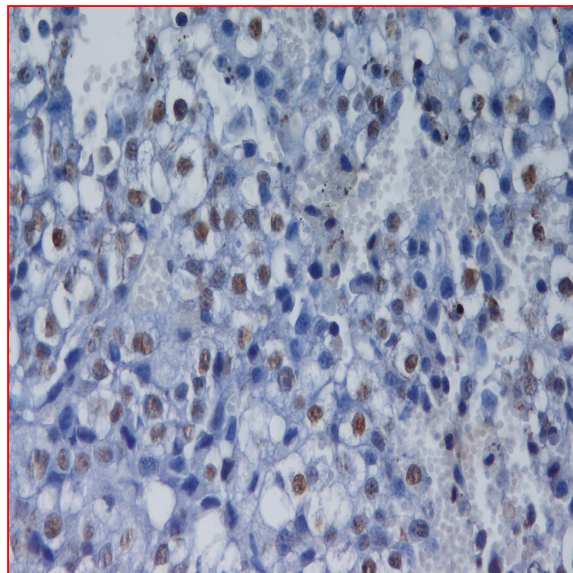
S100 in melanoma di topo nudo xenotrapiantato M14

Figura 5



CAF-1 p 60 in melanoma di topo nudo xenotrapiantato M14

Figura 6



CAF-1 p 60 in melanoma di topo nudo xenotrapiantato B16